

鸡蛋壳溶菌酶分离纯化工艺研究

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 咸阳 712081) 宋宏新 薛海燕 杨芳

摘要:以鲜鸡蛋壳为原料, 1.0% NaCl (pH3.0, 40°C) 提取溶菌酶, 724 大孔阳离子树脂色谱纯化, 10% (NH₄)₂SO₄ 洗脱, 盐析结晶。用羧甲基纤维素 CM52 柱色谱分析, 显示产品纯度较高。

关键词:溶菌酶, 鸡蛋壳, 离子交换

Abstract: Lysozyme was extracted from egg-shell using 1.0% NaCl (pH3.0) at 40°C and purified by ion-exchange chromatography with resin cation. The result analyzed by CM-cellulose showed that the active component of elution had a high purity.

Key words: lysozyme; egg-shell; ion-exchange chromatography

中图分类号: TS201.2*5 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2003)09-0060-03

食品添加剂

溶菌酶广泛存在于各种微生物、植物和高等动物组织及分泌物中, 以鲜鸡蛋蛋清中含量最高(约占蛋白总量的 3.4%~3.5%), 蛋壳中也含有。溶菌酶化学稳定性及热稳定性好, 可作为食品和饮料的天然防腐剂, 医学上用于消炎药的制备, 有消肿、恢复组织和抑制恶性组织生长的作用^[1]。作为生化试剂可用于细菌细胞破壁(原生质体的制备、质粒的提取、细胞内产物的分离), 还是一种研究蛋白质热力学稳定性的模式分子。本实验以新鲜蛋壳及蛋清残液为原料进行溶菌酶的提取, 采用弱酸性阳离子交换树脂动态交换、洗脱纯化工艺, 为规模化连续柱色谱生产高纯度溶菌酶提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜蛋壳 采自本实验室; 溶壁微球菌 AS1.634 中国科学院微生物研究所; 标准溶菌酶(酶活力>20000U/mg) 上海伯奥生物科技公司; 阳离子交换

树脂(724) 西安电力树脂厂; 羧甲基纤维素 CM52 树脂 Fluck 进口分装; 其他试剂 均为分析纯。

721 型分光光度计, 组合柱色谱系统, HD-97-1 核酸蛋白检测仪($\lambda=280\text{nm}$), 超滤 MILLPORE。

1.2 检测方法

1.2.1 溶菌酶活力测定^[2] 用 LB 培养基对溶壁微球菌进行活化、扩培, 离心收获菌体, 生理盐水洗涤, 1/15 (mol/L) 磷酸缓冲液 (pH6.46) 悬浮为 2mg/mL 菌悬液, 置于冰箱的冷冻室, 使用时解冻。以 2mg/mL 溶壁微球菌菌悬液为底物, 30°C 时 5mL 菌悬液中加入 1mL 溶菌酶, 在 $\lambda=450\text{nm}$ 处测 30s 及 5min30s 时菌悬液光密度。一个溶菌酶单位为此条件下, 平均每分钟光密度降低 0.001 所用的酶量。

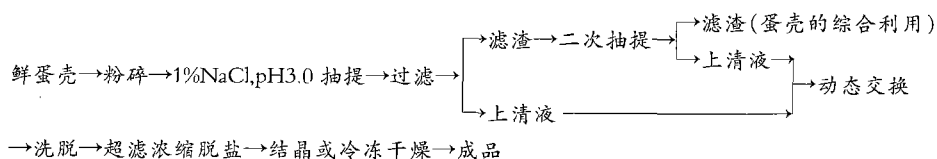
$$\text{溶菌酶活力} = \Delta E_{450} / 0.001 \times W (\text{U/mg})$$

式中: ΔE_{450} 为 450nm 处平均每分钟吸光度的变化, W 为加入的酶量 (mg)。

1.2.2 蛋白质含量的测定 采用 Folin-酚法^[3]。

1.2.3 溶菌酶纯度检验 采用 CM52 羧甲基纤维素色谱柱分别对上样液、洗脱液及标准溶菌酶进行分析。

1.3 溶菌酶的提取工艺流程



1.4 实验方法

1.4.1 溶菌酶的提取 将鲜蛋壳清洗冲去杂物, 4°C 放置过夜, 取 450g 粉碎成末, 用 1.0% NaCl 溶液 (pH3.0) 抽提, 共 1350mL 分 3 次抽提, 每次 40°C 水浴搅拌保温 1h, 趁热过滤, 合并 3 次抽提液即为酶抽提液, 抽提液 pH 自然上升到 6.0。蛋壳可作进一步综合利用。

1.4.2 溶菌酶分离纯化 酶抽提液中含大量的 Ca²⁺ 及杂蛋白, 为避免 Ca²⁺ 及杂蛋白的吸附影响柱子的总交换容量, 使用等电点沉淀及热变性对酶抽提液进行前处理, 即将酶抽提液调至 pH=4.6 (卵粘蛋白等电

收稿日期: 2003-01-28

作者简介: 宋宏新(1959-), 男, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学、食品科学方面的教学科研工作。

基金项目: 陕西省教育厅专项科研计划项目, 编号: 2000JK226。

表1 蛋壳中溶菌酶提取与离子交换色谱纯化结果分析

	酶液体积(mL)	酶活力(U/mL 酶液)	总蛋白含量(mg/mL)	比活力(U/mg 蛋白质)	吸附率(%)	回收率(%)
抽提液	1200	320	117.14	2.735	-	100
动态交换	1500	278	0.0871	3.194×10^3	83.5	109
动态交换残液	1200	84	105.12	0.799	-	-
静态交换	1100	343	0.146	2.349×10^3	74.8	98
静态交换残液	1200	106	107.30	0.988	-	-

注:吸附率=动态交换总酶活/(动态交换总酶活+动态交换残液总酶活) $\times 100\%$;回收率=动态交换总酶活/抽提液总酶活 $\times 100\%$ 。

点),于沸水浴迅速升温至 75°C ,维持5min,流水冷却至室温,用20%NaOH调pH至9.5(使 Ca^{2+} 形成沉淀),静置5~6h,过滤或离心除去沉淀,再将pH调至中性。

724树脂经浸泡处理去杂质,以2mol/L NaOH转型为 Na^+ 型阳离子树脂,1/15(mol/L)磷酸缓冲液(pH6.46)平衡过夜。

动态交换法是将处理转型后的树脂装柱,酶抽提液以1.6mL/min流速缓慢通过(2g 蛋壳粉/mL树脂)处理好的724树脂柱,再用3倍体积1/15(mol/L)磷酸缓冲液(pH6.46)洗涤树脂柱,除去未吸附杂质(蛋白),以10%(NH_4) $_2$ SO $_4$ 溶液洗脱,洗脱液经核酸蛋白检测仪($\lambda=280\text{nm}$)检测,部分收集器收集含溶菌酶的洗脱液。树脂则进行充分清洗转型后备用。

静态交换法即用处理好的724树脂对酶抽提液在室温慢速搅拌下吸附6h, 4°C 静置24h,将树脂滤出,用磷酸缓冲液洗涤树脂,洗至基本无泡沫为止。再以1200mL10%(NH_4) $_2$ SO $_4$ 分3次搅拌洗脱,合并所得洗脱液。

1.4.3 洗脱液中溶菌酶的结晶 含酶洗脱液经截留分子量(MWCO)为5000的聚砜膜超滤浓缩脱盐,冷冻干燥得成品。亦可加终浓度至5%的NaCl, 4°C 静置24h得结晶。

2 结果与分析

2.1 抽提条件确定及抽提结果

溶菌酶在酸性条件下耐热性较好,盐离子是蛋壳中抽提的关键,选用1.0%NaCl(pH3.0)溶液提取。5mL酶抽提液经CM52羧甲基纤维素色谱柱,10%(NH_4) $_2$ SO $_4$ 洗脱分析,色谱图如图1。测得峰2有溶菌酶活性,表明溶菌酶被抽提出来,同时可见其中含有较多杂蛋白。

2.2 树脂及交换条件的选择

为了保持大分子物质的活性,离子交换宜在中性pH进行,溶菌酶的等电点在11.0左右,在中性(pH6.46)下带正电荷;此pH时,大多数其它卵清蛋白带负电荷,故选用弱酸性大孔阳离子交换树脂724。以(NH_4) $_2$ SO $_4$ 梯度洗脱为依据,选用10%(NH_4) $_2$ SO $_4$ 一步洗脱法。

2.3 动态交换与静态交换的比较

由表1可知,使用724树脂交换使酶液比活力大大提高,提高了酶液纯度。动态交换的吸附率达到

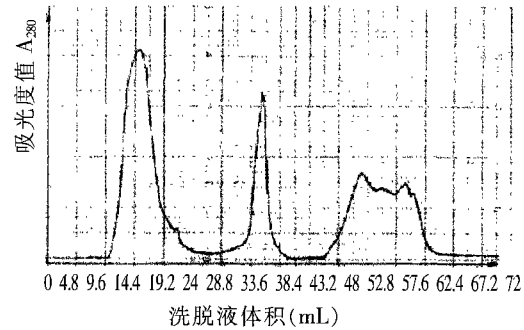


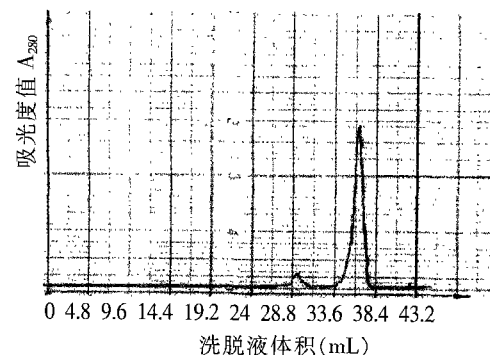
图1 酶抽提液CM52洗脱色谱图

83.5%,静态交换的吸附率亦达到74.8%,都较高,表明724树脂对溶菌酶有较好的交换性能。动态交换的酶液比活力高于静态交换,而每毫升酶液酶活单位数低,这是由于要充分动态洗脱,稀释了酶液,从而增加了后续浓缩脱盐的负荷。用离子交换纯化蛋壳溶菌酶回收率高于100%,类似现象有文献报道,因溶菌酶在吸附时,与其结合的某种限制因子被吸附去除,从而酶活力增大。

2.4 洗脱液分析

将5mL离子交换洗脱液加入经处理的CM52纤维素树脂柱,10%(NH_4) $_2$ SO $_4$ 洗脱,紫外核酸蛋白质检测仪检测,记录仪记录结果,部分收集器收集洗脱液,收集出峰位置洗脱液进行酶活检测。用相同方法对2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶菌酶对照分析,其洗脱色谱图如图2和图3。

由图2和图3可见,两者主峰出峰位置相同,经检测该峰有溶菌酶活性,所得洗脱液中含有溶菌酶。图3中其余小峰无酶活性,表明洗脱液中杂蛋白含量低,鸡蛋壳溶菌酶经724树脂离子交换达到了较

图2 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶菌酶CM52洗脱色谱图

(下转第63页)

表2 果汁部分质量指标分析结果

实验编号	空白	酶1	酶2	酶3
胡萝卜汁	B	1	2	3
果汁重量(g)	622.0	674.0	685.0	681.7
出汁率(%)*	53.1	60.6	62.1	61.7
出汁率增幅(%)	-	14.1	16.9	16.2

注:* 加水量 250g; 胡萝卜重量 700g。

表3 果汁样品中总胡萝卜素含量测定结果

实验编号	B	1	2	3
V(mL)	15	15	15	15
A_{478nm}	0.224	0.239	0.262	0.352
胡萝卜素提取量(mg/kg)	14.73	17.92	20.17	26.86
提取率增幅(%)	-	21.7	36.9	82.3

Pectinex Smash XXL 和 Pectinex Ultra SP-L 是果胶裂解酶和适量细胞破壁酶, 两者促使胡萝卜细胞更为彻底地破裂。胡萝卜素是细胞的内含物, 随着细胞壁的分解, 胡萝卜素得到了更大的释放。实验结果充分证明了这一点, 以 90mL/t 的剂量处理后, 胡萝卜素的提取率较空白样品而言提高了约 1.8 倍。

2.3 酶处理对胡萝卜汁稳定性的影响

评价果汁稳定性的方法很多, 最常用的是在一定温度下放置一段时间(如 3d 或 7d), 但是这种方法耗时比较长。在本实验中采用离心的方法来评价。离心力可以破坏果汁体系的稳定性, 从而产生沉淀。体系稳定性越好, 沉淀将会越少。以下是对各样品离心

实验的结果。结果表明, 酶制剂的使用量控制在 90mL/t 的范围时, 不会导致果汁稳定性变差, 酶处理后的果汁其稳定性和空白样品一致。

表4 酶处理对果汁离心沉淀高度的影响

实验编号	B	1	2	3
沉淀高度(cm)	1.30	1.35	1.35	1.30

3 结论

Pectinex Smash XXL 和 Pectinex Ultra SP-L 可以成功地应用于胡萝卜汁的加工以提高胡萝卜汁的品质。在合理的添加量下(90mL/t 左右), 酶制剂可以显著地提高出汁率和果汁中胡萝卜素含量, 更为重要的是不影响胡萝卜汁的稳定性。该结果对实际工业应用具有较高的参考价值。

参考文献:

- [1] 林志明, 王文振, 李诚志. 不同前处理对胡萝卜汁榨出率等参数的影响[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2001, 29(2): 128~131.
- [2] 周浓. 胡萝卜汁饮料生产工艺[J]. 农牧产品开发, 2000(11): 25~26.
- [3] 俞中, 林春国, 朱凤涛. 酶制剂 Citrozyme Premium L 和 Cellubrix L 在胡萝卜汁生产中的应用比较[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 86~87.
- [4] 杨军, 赵学慧. 果胶酶在胡萝卜汁加工中的应用[J]. 中国酿造, 1997(6): 24~27.

(上接第 61 页)

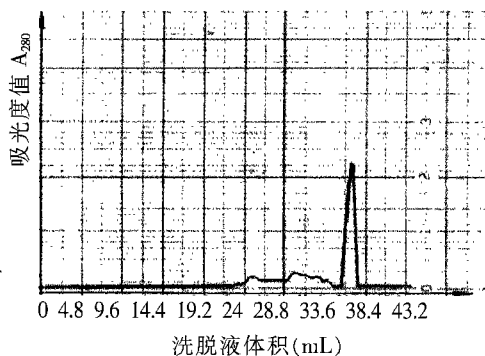


图3 724 树脂离子交换洗脱液 CM52 洗脱色谱图

好分离纯化效果。动态交换法易于实现连续化、自动化操作, 因此应对动态法作进一步研究。

3 结束语

商业溶菌酶通常采用传统的结晶、沉淀、离心等方法从蛋清中提取, 这些方法操作简单、成本低, 适于工业化生产, 但得到的产品纯度不高。目前, 已有超滤^[6]、扩张床吸附^[7]及离子交换色谱方法^[8]进行蛋清溶菌酶纯化的研究, 蛋壳溶菌酶的研究较少。超滤法易于放大, 但蛋清中粘蛋白含量高, 所以超滤前必须进行微滤, 还须选择合适的 pH、透过压和超滤膜等。扩张床吸

附能直接处理含固体颗粒的样品而引起了广泛关注, 但该方法自身还处于研究中。由于溶菌酶的等电点高于其它卵清蛋白, 使用离子交换色谱柱有很好的纯化效果。本工艺使用 724 树脂纯化溶菌酶性能好, $(NH_4)_2SO_4$ 洗脱成本低, 可实现鸡蛋的综合深加工利用。

参考文献:

- [1] 贾向志, 李元, 马文煜. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2001, 13(5): 374~377.
- [2] [德]B 施特马赫著, 钱嘉渊译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
- [3] 宋宏新, 李敏康. 现代生物化学实验技术教程[M]. 陕西: 陕西人民出版社, 2002.
- [4] R Gosh, S S Silva, et al. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration[J]. Biotechnol Bioeng, 2000(6): 19~24.
- [5] X D Tong, X Y Dong, Y Sun. Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent[J]. Biotechnol Bioeng, 2002(12): 117~124.
- [6] F Ming, J A Howell, F Acosta, J Hublle. Study on separation of conalbumin and lysozyme from high concentration fresh egg -white at high flow rates by a novel ion-exchanger[J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 42: 1086~1090.